

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16109

研究課題名（和文）in vivo環境における分裂期オルガネラの3Dダイナミクス解明

研究課題名（英文）Elucidation of 3D dynamics of mitotic organelles in vivo

研究代表者

久住 聡（Kusumi, Satoshi）

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：00758039

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、オスミウム浸軟法と連続切片走査電子顕微鏡(SEM)法を用いて、in vivo環境で分化・成熟した細胞の分裂期オルガネラ動態を三次元的に可視化することで、ゴルジ装置が分裂期中に断片化することなく層板構造を維持することが明らかとなった。この際、分裂期に細分化したゴルジ装置の特定が難しいため、新たな3Dイメージング技法を開発した。この手法を用いることで、分裂期のゴルジ装置を正確に同定した上で、その動態を形態解析することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題において、これまで培養細胞を中心に解析されてきた分裂期のオルガネラ動態に対し、in vivo環境で分化・成熟した細胞では異なる分裂期ダイナミクスが存在することを示すことができた。また、本研究で開発を進めた最新の3D電子顕微鏡技法は、これらのオルガネラ動態の形態解析に不可欠であるとともに、そのメカニズムを解明する一助となることが明らかであり、当該分野の発展へ大きく寄与することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have visualized three-dimensional (3D) organelle dynamics in differentiated cells during mitosis and revealed that the mitotic Golgi apparatus maintains its laminae structure without fragmentation by using an osmium maceration method and a serial section scanning electron microscopy (SEM) method. Since it is difficult to identify the subdivided Golgi apparatus during mitosis by only morphological observation, we developed novel 3D imaging techniques. Using these techniques, we could accurately identify the mitotic Golgi apparatus and analyze the morphology of its dynamics.

研究分野：解剖学

キーワード：分裂期オルガネラ 走査電子顕微鏡 連続切片SEM法 光電子相関顕微鏡法 オスミウム浸軟法

1. 研究開始当初の背景

細胞分裂に伴う膜性オルガネラのダイナミクスの詳細については、様々な条件で詳細な解析が行われ、広く一般化されているが、その知見は培養細胞を用いた解析により得られたものが多い。例えばゴルジ装置では、分裂時の動態が二段階に分かれることが知られている。つまり、はじめに横方向の繋がり(ゴルジリボン)が途切れていくつかのパーツに分かれ、次に微細(層板)構造を崩して細かく断片化(小胞化)することが報告されている(引用文献①)。また、小胞体については、一般的に粗面小胞体が層状構造を、滑面小胞体が管状構造を呈するとされるが、分裂期にはそれらの構造が再構成されると考えられている(引用文献②)。その結果として、小胞体(粗面・滑面含め)全体が層板状、もしくは管状になるということで意見が分かれている。さらに、ミトコンドリアでは、それまで頻繁に行われている融合と離散が静止し、細胞分裂に伴い断片化することが報告されている(引用文献③)。

一方、*in vivo*環境では分化した細胞が細胞分裂を起こしている様子がしばしば観察されるが、特に授乳期の雌ラットでは、下垂体が正常時の数倍に拡大し、その大半をPRL細胞が占めている(引用文献④)。この下垂体組織では、多くの細胞分裂像が確認でき、その大半が分化したPRL細胞である。また、CCKを長期投与したラットでは、膵腺房細胞の著しい拡大が見られ、その結果、膵臓自体の増大がみられる。さらに腺房細胞、腺房中心細胞、介在部細胞、導管の細胞でそれぞれ細胞分裂像も確認される(引用文献⑤)。しかしながら、生体内で分化・成熟した細胞が示すこれらの細胞分裂について、これまで詳細な解析は行われておらず、その三次元(3D)ダイナミクスは明らかになっていない。

私たちはこれまで、正常ラット下垂体前葉組織中において、分化・成熟した内分泌細胞の細胞分裂像を確認し、その細胞内微細構造を光学顕微鏡や透過電子顕微鏡に加え、オスミウム浸軟法により解析してきた。その結果ラット下垂体前葉細胞では、間期において小胞体が数枚重なった層状構造を示し、ゴルジ装置は球状構造を呈しているのに対し、分裂期では、正常構造とは大きくオルガネラの形態が異なっていることに気づいた。しかしながら、オスミウム浸軟法による解析では試料の切断面を観察するため、その深部に隠れたオルガネラの情報については解析が困難である。一方、分化した細胞では、その細胞内の3D形態や配置が細胞ごとに大きく異なっており(引用文献⑥、⑦)、さらには分裂期のダイナミクスに伴うオルガネラの形態変化や断片化は細胞内全体でみられることから、一般的な単一切片解析だけでは、その全体像をイメージすることが不可能である。そのため、これらの分裂期細胞の三次元動態については形態解析が不十分であった。

そこで、生体内の分化・成熟細胞において、その特徴的な形態を示すオルガネラが分裂期にどのような3Dダイナミクスを示すのか明らかにするため、これまで我々が開発してきた先端的3Dイメージング技法(オスミウム浸軟法や連続切片SEM法)が効果的であると考え、本研究課題を立案するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、生体内の分化・成熟した細胞の分裂期ダイナミクスについて、先端的3D技法によって解析することで、特にその膜性小器官にみられる形態変化を三次元的に明らかにする。具体的には、*in vivo*環境で分裂が見られるラットの下垂体前葉細胞などに対し、私たちがこれまで確立してきた3Dイメージング技術による三次元微細形態解析を試みる。特に、先端的SEM技法として(1)オスミウム浸軟法による膜小器官の観察、(2)連続超薄切片の走査電子顕微鏡(SEM)立体再構築法(連続切片SEM法)の二つを中心に据え、3D微細形態解析を行う。また、オルガネラ形態解析に有効な新たなイメージング技法の開発も同時に行う。

3. 研究の方法

(1) 分裂細胞観察の効率化

3D形態解析に先立ち、去勢ラットと授乳ラットにおいて、分裂細胞が多く観察できる条件について確立した。具体的には、去勢ラットは去勢後の日数を、授乳ラットは出産後の日数について条件検討し、パラフィン切片もしくは樹脂包埋した試料の準超薄切片を作製して細胞分裂の頻度を検証した。

(2) 間期・分裂期細胞の3D解析

はじめに正常ラットの下垂体前葉細胞の形態解析を行い、次に実験系(去勢ラットと授乳ラット)を用いて、分裂期の各ステージについて、それぞれ以下の手法で包括的に3D解析を行った。

① オスミウム浸軟法による SEM 観察

深麻酔下の成獣ラット(コントロール、去勢、授乳)を 0.5%グルタルアルデヒドと 0.5%パラホルムアルデヒドの混合液で灌流固定し、下垂体を摘出した。次に、四酸化オスミウムで後固定し、凍結切断後、0.1%四酸化オスミウムにより浸軟処理を行った。オスミウム浸軟法は、オスミウムによって可溶性蛋白質を溶かし出し、細胞内膜構造の SEM 観察を可能にした非常に強力な手法である(図 1)。そのため、オルガネラの 3D 微細形態をダイレクトに観察することが可能であり、分裂期の動態をとらえるのに有効と考えられる。

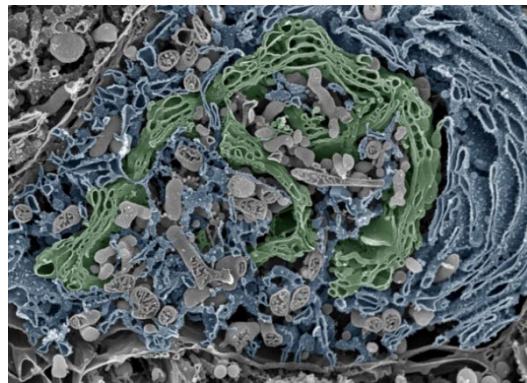


図 1. オスミウム浸軟法により観察した下垂体前葉細胞。この手法を用いることで膜性オルガネラの 3D 微細構造の観察が可能になる。緑：ゴルジ装置、青：粗面小胞体。

② 厚切り切片による蛍光 3D イメージング

細胞内全体のオルガネラ動態を捉えるため、共焦点レーザー顕微鏡による蛍光 3D イメージングを行った。具体的には、パラフィンもしくは凍結厚切り切片を切削後、オルガネラマーカーにより免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で撮影した。得られた連続像を立体再構築することで、分裂細胞のオルガネラにおける蛍光 3D イメージングを行った。

③ 連続超薄切片の SEM 立体再構築法による 3D 微細形態解析

我々はこれまで、樹脂包埋した連続超薄切片を SEM 観察し、立体再構築することで、細胞小器官を立体的に解析する手法を開発してきた(図 2、引用文献⑥、⑧、⑨)。具体的には、0.5%グルタルアルデヒドと 0.5%パラホルムアルデヒドの混合液で灌流固定した試料を 1%四酸化オスミウムで後固定し、樹脂包埋した後に連続超薄切片を作製した。続いて、切片を SEM で観察し、得られた連続断層像を立体再構築した。

また、下垂体前葉には多種類の内分泌細胞が存在するため、免疫細胞化学的手技による細胞の同定が重要となる。そこで、連続切片 SEM 法と免疫染色を組み合わせた手法を開発し、応用を試みた(引用文献⑦)。

本研究では、これらの手法を用いて目的細胞の間期のオルガネラを三次元的に解析するとともに、分裂期細胞のオルガネラ動態についても形態的な解析を試みた。

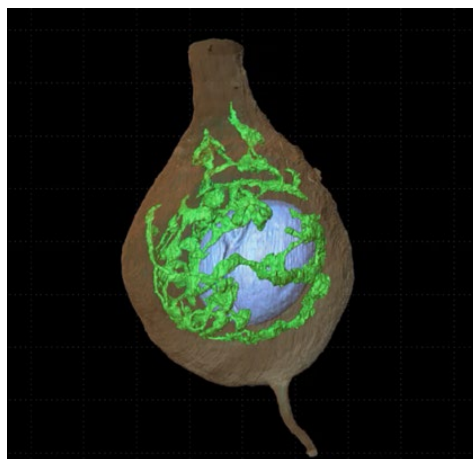


図 2. 連続切片 SEM 法によるゴルジ装置の 3D 構造解析例(プルキンエ細胞)。この方法を用いることで、細胞質の広領域を占める巨大なオルガネラ、ゴルジ装置の全体像を観察することができる。緑：ゴルジ装置、青：核、茶色：プルキンエ細胞。文献⑧より引用

4. 研究成果

(1) 分化・成熟した細胞の分裂期観察効率化

一般的に、正常ラットにおいて分化・成熟した細胞の分裂像がしばしば観察されるが、その頻度は高くはなく、体系的な形態解析を行うには不十分であった。そこで、特定の細胞が顕著に増加する系として去勢ラット、授乳ラットの下垂体前葉細胞に着目し、効率的な分裂細胞の観察を試みた。計画当初は、予備実験の結果から授乳ラットの下垂体前葉 PRL 細胞の分裂像について注目していたが、特に去勢後 1 週間程度のラット下垂体前葉性腺刺激ホルモン産生細胞(GTH 細胞)において比較的安定した分裂細胞の観察が可能であることがわかった(図 3)。また細胞径が大きくオルガネラ動態の形態解析に適していたことから、以後はこの系を中心とした解析を進めることとした。

(2) オスミウム浸軟法による GTH 細胞の解析

オスミウム浸軟法により、下垂体前葉 GTH 細胞の間期と分裂期の 3D 形態解析を行った。オスミウム浸軟

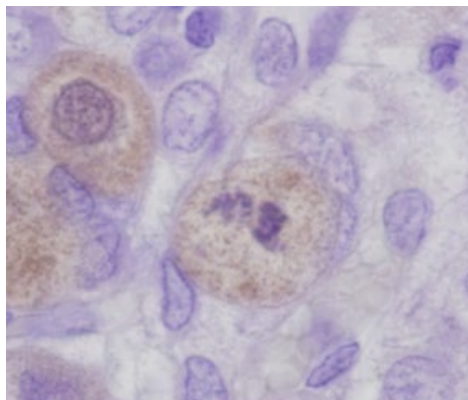


図 3. 去勢後 1 週間で見られた GTH 細胞の細胞分裂像。GTH 細胞を DAB で同定している。

像は、3D 再構築することなく膜性小器官を観察することが可能であるため、細胞内の微細な変化をダイレクトに捉えることができた。間期における GTH 細胞のオルガネラとしては、ゴルジ装置の発達が顕著であり、細胞の中心付近に球体状の特徴的な形状を示していた。また、粗面小胞体は広く拡張した管状形態を呈しているのが特徴的であった。

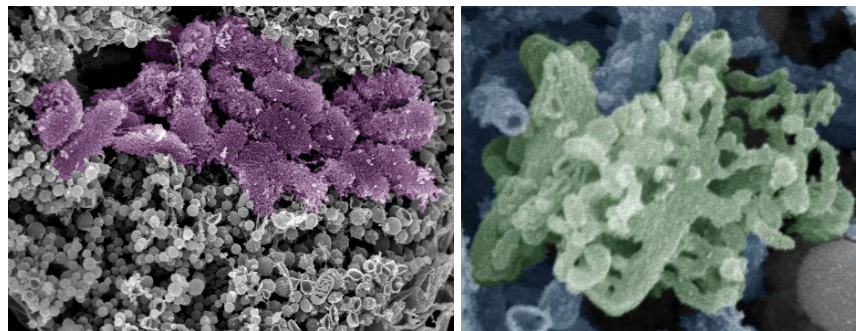


図 4. GTH 細胞の細胞分裂像(左)と分裂時のゴルジ装置(右)。紫：染色体、緑：ゴルジ装置、青：粗面小胞体。

一方、分裂期において顕著なダイナミクスを示したのはゴルジ装置であった。つまり、ゴルジ装置の断片化は分裂期を通して見られず、常に層板構造を維持している様子が観察された(図 4、論文投稿予定)。

(3) 連続切片 SEM 法による GTH 細胞のゴルジ解析

連続超薄切片を用いた 3D イメージング技法は、細胞全体の解析を行うのに非常に適している。近年、私たちは超高分解能 SEM を用いることで、連続切片 SEM 法によりゴルジ装置を各層板ごとに可視化することに成功している(図 5)。

また、下垂体前葉には多種類の内分泌細胞が存在しているため、連続切片 SEM 法と免疫電顕法を組み合わせることで細胞の特定を行うことができた(図 6)。

しかしながら、形態のみでは分裂時に分散化(ミニスタック化)したゴルジ装置を正確に同定するのは難しい。そこで本研究では、オスミウム染色法(シス染色法)と連続切片 SEM 法を組み合わせることで、このミニスタックの同定を試みた。

さらに近年は、連続超薄切片による蛍光イメージングと連続切片 SEM 法を組み合わせる新たな 3D CLEM 法の開発を進めている(論文投稿予定)。

上記の手法を用いることで、GTH 細胞の分裂期ゴルジ動態を示すことができた。オスミウム浸軟法で示されたミニスタックの 3D 微細構造と、連続切片 SEM 法による細胞内全体の構造を組み合わせることで、より正確なゴルジ動態の把握に有効であった。今後は他の内分泌細胞についても形態解析を進める予定である。また現在、in vivo 解析に留まらず、培養細胞の分裂期オルガネラ動態についても解析を進めており、その両者を比較検討することで、さらなるメカニズムの解明を目指す。

<引用文献>

- ① Wei JH, Seemann J: Golgi ribbon disassembly during mitosis, differentiation and disease progression. *Curr Opin Cell Biol.* 47: 43-51, 2017.
- ② Jongsma ML, Berlin I, Neefjes J: On the move: organelle dynamics during mitosis. *Trends Cell Biol.* 25: 112-124, 2015.
- ③ Kanfer G, Kornmann B: Dynamics of the mitochondrial network during mitosis. *Biochem Soc Trans.* 44: 510-516, 2016.

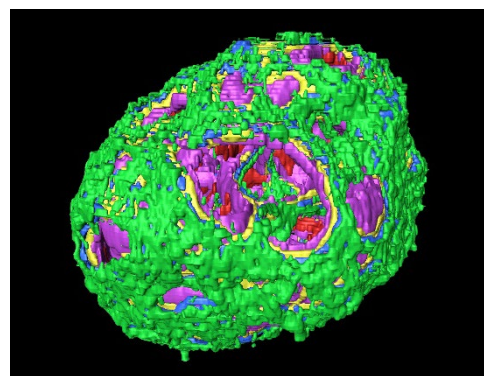


図 5. 間期の GTH 細胞ゴルジ装置の 3D 再構築像。緑：シス、青・黄・紫：中間、赤：トランス。

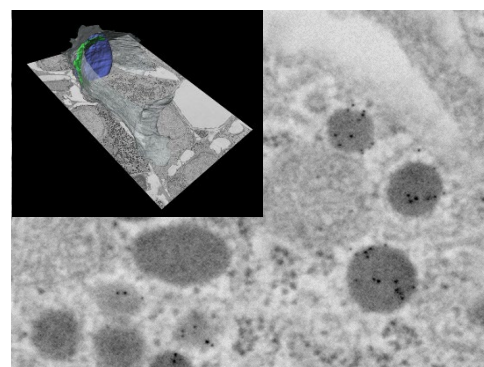


図 6. PRL 細胞の 3D 再構築像(挿入図)と免疫電顕像。免疫電顕法により正確に特定した細胞を 3D 再構築できるようになった。分泌果粒上の金コロイド(PRL)に注目。緑：ゴルジ装置、青：核、灰色：PRL 細胞。

- ④ Kurosumi K: Functional classification of cell types of the anterior pituitary gland accomplished by electron microscopy. *Arch Histol Jpn.* 29: 329-62, 1968.
- ⑤ Yanatori Y and Fujita T: Proposal of a Neurosecretory System in the Pancreas. An Electron Microscope Study in the Dog. *Arch Histol Jpn.* 42:277-295, 1979. Koga D, Kusumi S and Ushiki T: Three-dimensional shape of the Golgi apparatus in different cell types: serial section scanning electron microscopy of the osmium-impregnated Golgi apparatus. *Microscopy*, 65: 145-157, 2016.
- ⑥ Koga D, Kusumi S, Ushiki T: Three-dimensional shape of the Golgi apparatus in different cell types: serial section scanning electron microscopy of the osmium-impregnated Golgi apparatus. *Microscopy*, 65: 145-157, 2016.
- ⑦ Koga D, Kusumi S, Ushiki T, Watanabe T: Integrative method for three-dimensional imaging of the entire Golgi apparatus by combining thiamine pyrophosphatase cytochemistry and array tomography using backscattered electron-mode scanning electron microscopy. *Biomed Res*, 38: 285-296, 2017.
- ⑧ Koga D, Kusumi S, Shibata M, Watanabe T: Applications of Scanning Electron Microscopy Using Secondary and Backscattered Electron Signals in Neural Structure. *Front Neuroanat*, 15, 2021.
- ⑨ Koga D, Kusumi S, Watanabe T: Backscattered electron imaging of resin-embedded sections. *Microscopy*, 67: 196-206, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Koga D, Kusumi S, Shibata M, Watanabe T	4. 巻 15
2. 論文標題 Applications of Scanning Electron Microscopy Using Secondary and Backscattered Electron Signals in Neural Structure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Neuroanat.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnana.2021.759804	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Koga D, Kusumi S, Watanabe T	4. 巻 41
2. 論文標題 Optimizing the reaction temperature to facilitate an efficient osmium maceration procedure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomed Res.	6. 最初と最後の頁 161-168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2220/biomedres.41.161	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Horie M, Yoshioka N, Kusumi S, Sano H, Kurose M, Watanabe Iida I, Hossain I, Chiken S, Abe M, Yamamura K, Sakimura K, Nambu A, Shibata M, Takebayashi H	4. 巻 68
2. 論文標題 Disruption of dystonin in Schwann cells results in late onset neuropathy and sensory ataxia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 2330-2344
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/glia.23843	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久住聡、甲賀大輔、柴田昌宏
2. 発表標題 Section Face Imagingにおける条件検討
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第76回学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久住聡、甲賀大輔、柴田昌宏
2. 発表標題 走査電子顕微鏡による培養細胞の三次元形態解析
3. 学会等名 第127回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	甲賀 大輔 (Koga Daisuke) (30467071)	旭川医科大学・医学部・准教授 (10107)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------